

Vieillessement de l'appareil photosynthétique I. Effet synergique de la lumière et du vieillissement *in vitro* sur les changements de volume de chloroplastes isolés d'épinard

PAUL-ANDRÉ SIEGENTHALER

Laboratoire de Physiologie végétale, Institut de Botanique, Université de Neuchâtel, 2000 Neuchâtel 7, Suisse

(Reçu le 24 Mai 1969)

Ageing of the photosynthetic apparatus I. Synergetic effect of light and ageing in vitro on the volume changes of isolated spinach chloroplasts

In view of the difficulty of studying all of the aspects of ageing of the photosynthetic apparatus *in vivo* and of the action of light upon this phenomenon, the consequences of chloroplast ageing were investigated *in vitro*, especially on the volume of these organelles.

It was found that at 20°C in a Tris-NaCl medium, chloroplast swelling occurred slowly in the dark for the 6 hr experimental period, while it was activated in the light, with an optimum after 90 min. The most characteristic feature of these 2 curves is that they cross each other after 5 hr, indicating that, independent of the previous treatments (dark or light), the chloroplasts *in vitro* reach the same volume after a few hours. Special attention was devoted to the pH effect. In dark and light conditions, swelling was found to be maximum at pH 7.5 to 8.5 and was independent of the buffer used. There was no major difference between swelling in Tris and Tricine. A marked depression in the chloroplast volume was observed at pH 4.5 in the dark and at pH 5.5 in the light.

Simultaneous with the swelling phenomenon, the capacity of chloroplasts to carry out light-dependent shrinkage diminished. There was a striking parallelism between swelling rate and loss of chloroplast shrinkage capacity. The action of light is synergetic on both these processes in that it accelerated to the same extent both the dark-swelling and the inhibition of light-dependent shrinking in chloroplasts incubated in the dark.

L'organisation structurale et la fonction des chloroplastes foliaires subissent des altérations au cours de processus attribués au vieillissement. Les causes et les conséquences du vieillissement des plastides *in vivo* sont difficiles à déceler. En outre, la notion de vieillissement chez le chloroplaste n'est pas la même pour tous les auteurs. Pour certains d'entre eux, le vieillissement est une *progression en âge* qui se manifeste constamment dès le moment où le proplaste s'engage, au cours du temps, dans la voie qui le conduit à se transformer ontogéniquement en chloroplaste. Pour d'autres auteurs, le vieillissement désigne l'évolution, dans le temps, du chloroplaste *au delà du stade adulte*, évolution généralement considérée comme liée à des conditions anormales ou défavorables (1).

Les observations de CATSKY et SLAVIK (2) sur le chou fourrager sont à cet égard riches en enseignements. L'activité photosynthétique, mesurée par la quantité de CO₂ assimilée, augmente considérablement de la première feuille à partir du

sommet de la plante, soit de la feuille la plus jeune, jusqu'à la 10^e feuille. Une feuille d'un numéro d'ordre donné représente donc une étape bien définie dans l'évolution (ou le "vieillissement") de l'appareil photosynthétique. La série ontogénique des feuilles donne une image des variations de la photosynthèse au cours de la progression en âge de l'appareil photosynthétique. Mais la notion de vieillissement peut être envisagée d'une manière différente. CATSKY et SLAVIK (2) constatèrent en effet que de la 10^e à la 21^e feuille, l'activité photosynthétique diminue sensiblement pour prendre une valeur voisine de 0 chez la feuille ontogéniquement la plus vieille. Dans cette perspective, le vieillissement commencerait à partir du stade adulte (10^e feuille dans l'exemple considéré) où l'on enregistre une diminution de l'activité photosynthétique. Ces quelques considérations suffisent à montrer que l'étude du vieillissement *in vivo* (ontogénique ou au-delà du stade adulte) est d'une très grande complexité et qu'à ce stade de nos connaissances des expériences réalisées avec des chloroplastes *in vitro*, bien qu'imparfaites sur le plan des relations avec les autres parties de la plante, peuvent apporter une contribution originale à l'étude du vieillissement de l'appareil photosynthétique (2, 3).

En 1965, PACKER, SIEGENTHALER et NOBEL mirent en évidence le gonflement des chloroplastes (4). Ce phénomène, lent à l'obscurité, est accéléré en présence de lumière et des cofacteurs nécessaires à un flux cyclique d'électrons. Mais, contrairement à la contraction des chloroplastes (5, 6), le gonflement de ces organites ne semble pas être en relation directe avec le transfert d'énergie conduisant à la synthèse d'ATP (4). Cependant, des substances qui agissent sur les réactions photochimiques de la photosynthèse comme les acides alkenylsucciniques (7), l'acétate de phénylmercure (7, 8), le phosphate (8), les acides organiques (9) et les inhibiteurs de la photophosphorylation (10) interfèrent avec ce phénomène, généralement en l'inhibant. Bien que l'on ne comprenne pas encore comment les réactions de flux des électrons de la chaîne photosynthétique sont impliquées dans le gonflement des chloroplastes activé par la lumière, ces observations semblent indiquer qu'il existe tout de même une relation entre ces deux processus. A cet égard, NOBEL (10) observe que le gonflement activé par la lumière est apparemment nécessaire à une absorption optimale du sodium et du strontium par les chloroplastes. En outre, de nombreux inhibiteurs de la phosphorylation de même que d'autres composés comme le formate et l'acétate inhibent autant le gonflement (9, 10) que l'absorption des ions (10).

L'un des aspects les plus intéressants du gonflement *in vitro* est qu'il est irréversible lorsque les chloroplastes ayant séjourné à la lumière sont replacés à l'obscurité. Cette propriété nous a suggéré que le gonflement pourrait être considéré comme une expression du processus de "vieillissement" (ou de détérioration) des systèmes membranaires du chloroplaste. La validité de cette hypothèse a reçu une confirmation par des observations au microscope électronique qui ont révélé une désorganisation complète du réseau lamellaire des chloroplastes gonflés (11-13). Pourtant la relation existant entre la désorganisation structurale des chloroplastes — provoquée par un séjour prolongé des plastides à l'obscurité et à la lumière — et leur capacité à photosynthétiser n'a pas été établie d'une façon claire. Si le gonflement des chloroplastes est réellement le résultat d'un "vieillissement", on doit s'attendre à une diminution concomitante des activités photochimiques pendant le gonflement des chloroplastes à l'obscurité et à un effet "synergique" de la lumière sur ces 2 processus.

Cette série d'articles est consacrée à l'étude des conditions et des conséquences d'un vieillissement *in vitro*, en absence et en présence de lumière, sur les changements de volume et les activités photochimiques de chloroplastes isolés.

Matériel et méthodes

Les chloroplastes de feuilles d'épinard sont préparées selon le procédé de WHATLEY et ARNON (14), adapté par SIEGENTHALER (15). Des feuilles d'épinard, provenant du marché local, sont soigneusement triées puis maintenues à l'obscurité à 4°C pendant 12 h. environ pour réduire la teneur en amidon. Après avoir détaché les nervures centrales, on conserve les limbes foliaires que l'on broie à l'aide d'un mélangeur électrique pendant 30 sec. dans un milieu contenant 175 mm de NaCl et 100 mm de tampon Tris-HCl (pH 8). La suspension ainsi obtenue est filtrée à travers deux couches de gaze hydrophile (qualité 10/9 de Schaffhouse) et le filtrat est centrifugé pendant 1 mn. à 500 $\times g$. La suspension surnageante est à nouveau centrifugée pendant 10 mn. à 1000 $\times g$ pour sédimenter les chloroplastes. Le sédiment de chloroplastes est mélangé avec soin dans le même milieu de suspension de façon à obtenir une concentration finale de 1,0 mg de chlorophylle par millilitre. Ces opérations, qui durent 20 mn. environ, se font à 4°C et à l'obscurité. La concentration en chlorophylle est déterminée par la méthode spectrophotométrique de WHATLEY et ARNON (14), modifiée par BRUINSMA (16).

Dans les expériences concernant l'influence du pH sur le volume des chloroplastes, ceux-ci sont isolés dans un milieu contenant uniquement du NaCl (175 mm) ajusté à pH 8. Après la dernière centrifugation, les chloroplastes sont mis en suspension dans 175 mm de NaCl et 50 mm des divers tampons ajustés aux pH indiqués.

Le vieillissement des chloroplastes *in vitro* est obtenu en laissant séjourner ces organites (1 mg de chlorophylle/ml) pendant une durée plus ou moins prolongée dans un milieu contenant généralement 175 mm de NaCl et 100 mm de tampon Tris-HCl (pH 8) à 20°C, soit à l'obscurité, soit à la lumière ($3,45 \times 10^5$ ergs \cdot cm⁻² \cdot sec⁻¹). Aux temps indiqués dans chacune des expériences, des échantillons sont prélevés dans les tubes à incubation pour la détermination du volume ou de tout autre activité photochimique des chloroplastes.

Les changements de volume des chloroplastes sont estimés par la méthode hématocrite adaptée aux chloroplastes (15). Seules les variations de volume des chloroplastes étant prises en considération dans cette étude, les volumes obtenus par sédimentation ne sont pas diminués de la valeur attribuable à l'espace libre entre les chloroplastes sédimentés. Dans certaines expériences, (v. Fig. 4 B), le gonflement des chloroplastes est évalué par la diminution de l'absorbance à 540 m μ ($-\Delta E_{540 \text{ m}\mu}$) (4). La capacité de contraction des chloroplastes est estimée par la méthode de la diffusion de la lumière (5) à l'aide d'un fluorimètre à photomultiplicateur (Photovolt, modèle 540) modifié à cet effet et muni d'une cuvette thermostatisée par un circuit d'eau maintenu à 20°C. Les filtres interférentiels primaire (Balzers B-40/539) et secondaire (Baird Atomic Interference Filter) ont pour fonction d'isoler la longueur d'onde 546 m μ et d'empêcher toute interférence avec la lumière actinique ($>600 \text{ m}\mu$) fournie par un filtre Kodak, wratten No 26, émise sur l'un des côtés de la cuvette. L'augmentation de l'intensité de la lumière

diffusée à la suite d'une illumination des chloroplastes est exprimée en % par rapport au niveau initial de lumière diffusée.

Résultats et discussion

La variation du volume de chloroplastes isolés en fonction de la durée de séjour de ces organites dans un milieu Tris-NaCl (pH 8) est illustrée dans la Fig. 1. Trois types de résultats y sont consignés (Exp. 1-3), représentant chacun l'un des types de courbes obtenu au cours d'une année d'expériences. Bien que le type 2 (Exp. 2) soit plus fréquent, il nous est impossible de dire avec certitude — vu l'hétérogénéité du matériel utilisé — quels sont les facteurs qui déterminent les différences observées. Des essais préliminaires semblent indiquer que l'âge des feuilles au moment de la récolte pourrait en être la cause. Dans tous les cas, cependant, l'augmentation de volume des chloroplastes est lente à l'obscurité et subit une accélération lorsque les plastides sont illuminés. Les courbes traduisant les variations de volume de ces organites ayant séjourné à l'obscurité et à la lumière se croisent plus ou moins rapidement indiquant qu'indépendamment du traitement subi (obscurité ou lumière), les chloroplastes *in vitro* finissent par présenter le même volume après quelques heures. Ces résultats sont en accord avec les observations

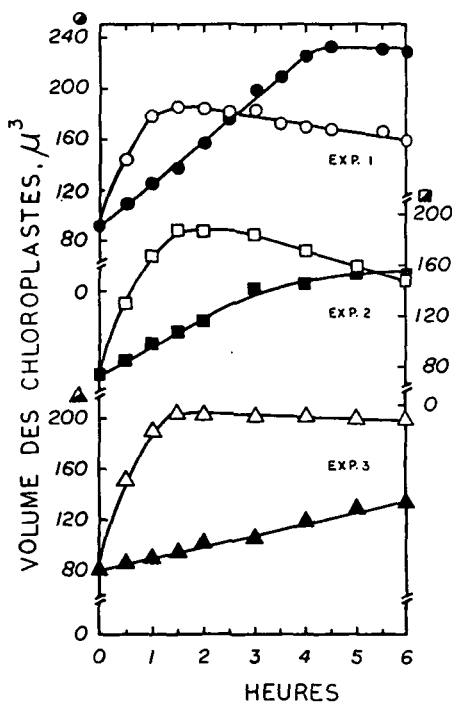


Fig. 1. Influence d'un séjour prolongé à l'obscurité (symboles fermés) et à la lumière (symboles ouverts) sur le volume de chloroplastes isolés. Exp. 1, 2 et 3 correspondent aux divers types de courbes que l'on peut obtenir.

de NISHIDA *et al.* (17) mais il nous fut impossible d'obtenir à la lumière, une diminution marquée du volume dans la phase faisant suite à l'état de gonflement maximum des chloroplastes observée par ces auteurs japonais. Des expériences visant à déterminer si la concentration en chlorophylle ou l'intensité lumineuse utilisée dans nos expériences pouvaient être la cause de cette différence furent infructueuses et confirmèrent l'aspect général des courbes reportées dans la Fig. 1.

En 1966, IZAWA et GOOD (18) mirent en doute l'existence du gonflement des chloroplastes en milieu Tris-NaCl décrit par PACKER *et al.* (4) en expliquant que l'action découplante de la fonction amine du Tris serait responsable de ce phénomène. Ceci nous a amené à entreprendre une étude comparée de l'action de divers milieux, à pH fixes et différents, sur le volume des chloroplastes isolés. Cette étude a été rendue difficile par le fait que la plupart des tampons utilisés, notamment ceux qui contiennent des phosphates (4), inhibent le gonflement des chloroplastes activé par la lumière. Le volume V_0 des chloroplastes ayant séjourné pendant 15 mn. dans divers tampons est minimum à pH 4,5 et maximum à pH 8,5 (Fig. 2). Après 60 mn. de séjour à l'obscurité, le volume V_{60} des chloroplastes augmente sensiblement dans la zone des pH compris entre 6 et 9. De part et d'autre de cette zone, le volume ne subit pratiquement aucune modification. Pour tous les tampons utilisés, y compris pour le tampon phosphate, les variations de volume des chloroplastes s'inscrivent dans une courbe continue: aucun effet spécifique de l'un des tampons ne peut donc être décelé. L'augmentation du volume V_0 des chloroplastes en fonction du pH est conforme aux résultats obtenus antérieurement (19-21). En outre, la dépression du volume à pH 4,5 observée également par MERCER *et al.* (19) et par DILLEY et ROTHSTEIN (21), a été expliquée par le fait qu'elle correspond au pH_i des chloroplastes et à une mobilité électrophorétique nulle de ces organites (19).

La conséquence d'un traitement lumineux sur la variation du volume des chloroplastes à divers pH est illustrée dans la Fig. 3. La zone de pH comprise entre 7 et 9 est la plus favorable à un gonflement des chloroplastes en présence de lumière. Mais, il est intéressant de noter qu'à la lumière le tampon phosphate est un puissant inhibiteur du gonflement. Ces observations sont en accord d'une part avec l'effet inhibiteur de ce composé sur le gonflement des chloroplastes illuminés à pH 8 observé par PACKER *et al.* (4) et, d'autre part, avec l'action stimulatrice du phosphate sur la contraction de ces organites décrite par SIEGENTHALER (8). Il convient également de remarquer que l'effet du phosphate varie en fonction du pH et qu'il est notamment moins inhibiteur à pH 8, pH auquel précisément le gonflement est maximum avec d'autres tampons. L'examen de la Fig. 3 n'écarte cependant pas la possibilité que des tampons contenant du Tris stimulent d'une façon spécifique le gonflement des chloroplastes à la lumière. Une telle éventualité a été étudiée en comparant, à diverses concentrations et au pH optimum de 8 (v. Fig. 4), l'action du tampon Tris (Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane) et celle de la Tricine (*N*-tris (hydroxyméthyl) méthyl glycine). D'après IZAWA et GOOD (18), ce dernier tampon, dont le pK_a est de 8,15 à 20°C, (le pK_a du Tris est de 8,3) ne peut être suspecté d'être un agent de gonflement ou de découplage. A l'obscurité, le tampon Tris provoque un gonflement des chloroplastes de 10% supérieur à celui obtenu en milieu Tricine pour des concentrations variant de 1 à 50 mm (Fig. 4 A; Fig. 4 B, symboles fermés); cette dernière concentration est utilisée, rappelons-le, dans les expériences comparatives reportées dans les Fig. 2 et 3. Un traitement lumineux pendant 60 mn.

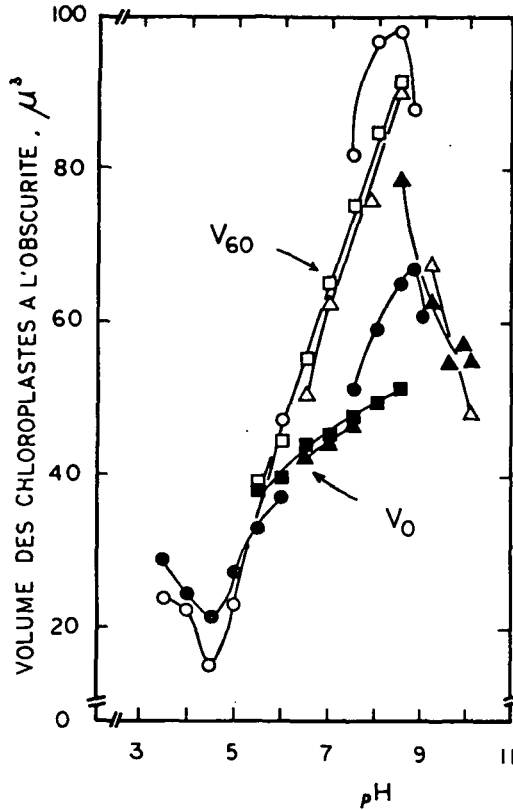


Fig. 2. Influence du pH sur le volume des chloroplastes à l'obscurité. Les chloroplastes sont isolés dans un milieu contenant uniquement du NaCl (175 mM) ajusté à pH 8,0. Après la dernière centrifugation (v. Méthodes) les chloroplastes sont mis en suspension dans une solution de NaCl (175 mM) et les divers tampons étudiés: ○, (pH 3,5 à 6,0) 50 mM de tampon citrate; □, (pH 5,5 à 8,5), 50 mM de tampon Tris-maléate; △, (pH 6,5 à 7,5), 50 mM de tampon phosphate, KH_2PO_4 ; ●, (pH 7,5 à 9,0), 50 mM de tampon Tris-HCl; ▲, (pH 8,5 à 10,0), 50 mM de tampon borax-NaOH. Les chloroplastes sont maintenus pendant 15 mn. dans leurs milieux respectifs (t_0) à température ambiante, puis incubés à 20°C pendant 60 mn. (t_{60}). Les volumes V_0 et V_{60} correspondants sont déterminés d'après la méthode chlorocrite. Les pH initiaux et finals réels mesurés à 0 et 60 mn. respectivement, sont pris en considération pour l'établissement des courbes.

(Fig. 4 B, symboles ouverts) provoque un gonflement marqué des chloroplastes par rapport à celui qui est observé à l'obscurité (Fig. 4 B, symboles fermés). Ce gonflement est du même ordre de grandeur pour les chloroplastes ayant séjourné dans les 2 types de tampons; une accélération spécifique du tampon Tris n'est observée qu'à des concentrations supérieures (500 mM par exemple) à celles utilisées dans nos expériences. Ainsi, l'étude comparée des variations de volume en milieux Tris et Tricine permet de conclure que le gonflement des chloroplastes isolés

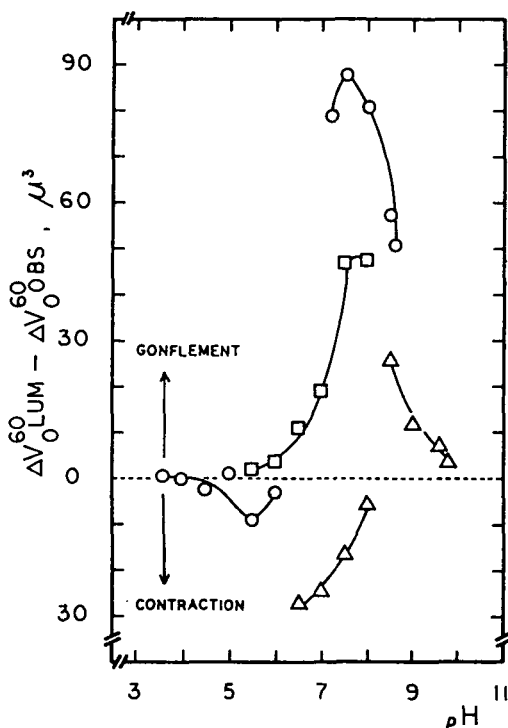


Fig. 3. Conséquence d'une illumination sur les variations de volume des chloroplastes isolés en fonction du pH. Les conditions expérimentales et les symboles sont les mêmes que ceux indiqués dans la légende de la Fig. 2.

représente, autant à l'obscurité qu'à la lumière, une évolution naturelle du plastide *in vitro* qui est indépendante du tampon utilisé et qui est maximum à $\text{pH } 8,0 \pm 0,5$.

Depuis les travaux de PACKER (5), de ITOH *et al.* (22), nous savons que les chloroplastes frais sont capables de se contracter *in vitro* sous l'action de la lumière dans la mesure où un accepteur ou un transporteur d'électrons est ajouté au système (6). Plus récemment, DILLEY et VERNON (6) ont montré que le phénomène de contraction était intimement lié aux processus de transfert de l'énergie au sein du chloroplaste. Dans cette perspective, il nous a paru intéressant de rechercher si le vieillissement *in vitro* des chloroplastes qui se manifeste, comme nous l'avons vu, par un gonflement de ces organites était de nature à altérer la capacité des plastides à se contracter dans les conditions optimales requises habituellement. Les résultats d'une telle expérience sont reportés dans la Fig. 5. Les chloroplastes ayant séjourné à la lumière subissent une inhibition très rapide de leur capacité à se contracter. Après une à 2 h. d'incubation, les plastides sont incapables de changer de volume sous l'action de la lumière. Quant aux chloroplastes demeurés à l'obscurité, ils subissent, eux aussi, une inhibition mais beaucoup plus lente. Dans nos conditions expérimentales, il faut attendre 4 à 6 h. pour obtenir une inhibition complète. Il existe un parallélisme frappant entre le gonflement des chloroplastes (v. Fig. 1,

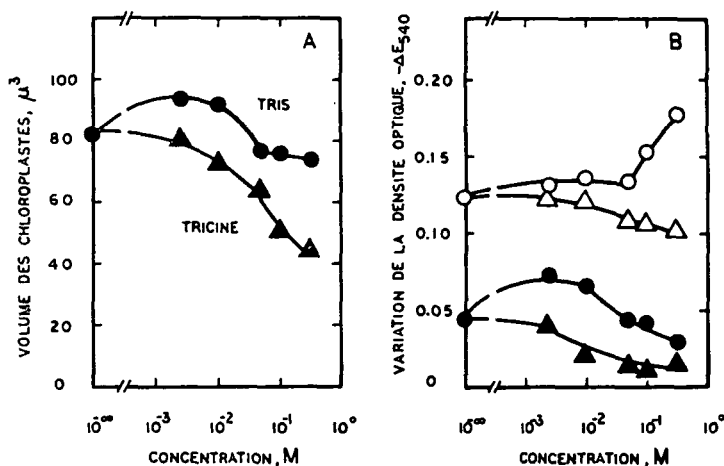


Fig. 4. Etude comparée de l'action du Tris et de la Tricine sur les variations de volume des chloroplastes isolés. Les chloroplastes sont isolés dans 175 mM de NaCl puis incubés dans le même milieu additionné de Tris ou de Tricine à pH 8 aux concentrations indiquées. A: Volume des chloroplastes au temps 0 déterminé par la méthode chlorocrite (concentration des chloroplastes: 1 mg de chlorophylle/ml). B: Volume des chloroplastes après 60 mn. d'incubation à l'obscurité (symboles fermés) et à la lumière (symboles ouverts) estimés par la méthode spectrophotométrique (concentration des chloroplastes: 20 μ g de chlorophylle/ml).

Exp. 2) et l'inhibition de la capacité de ces organites à se contracter (v. Fig. 5). En effet, la lumière a pour conséquence d'accélérer le gonflement des chloroplastes et d'inhiber, dans la même proportion, la capacité de ces organites à se contracter. En outre, le temps nécessaire à l'obtention de l'inhibition complète de ce phénomène qui survient, à la lumière après 2 h. de séjour des chloroplastes et, à l'obscurité, après 5 h. environ, correspond, dans l'un et l'autre cas, au temps requis pour obtenir un maximum de gonflement. Ces observations sont en accord avec l'hypothèse d'après laquelle le vieillissement des chloroplastes *in vitro* se manifeste par un gonflement irréversible des chloroplastes qui reflète une diminution concomitante des activités photochimiques des plastides (3).

Ce travail a pu être réalisé grâce à l'appui du Fonds national suisse de la Recherche scientifique (contrat No 5345) et à l'excellente collaboration technique de Melle TJOE TAN. Nous remercions également M. le Prof. C. FAVARGER, Directeur de l'Institut de Botanique de l'Université de Neuchâtel, qui a bien voulu discuter avec nous certains problèmes que pose l'étude du vieillissement des végétaux et qui nous a aidé à préciser nos idées sur ce sujet.

Références

- (1) SIRONVAL, C.: Commentaires. Dans *Le Chloroplaste, Croissance et Vieillessement*. Edité par C. SIRONVAL. p. 71. Masson et Cie, Paris, 1967.

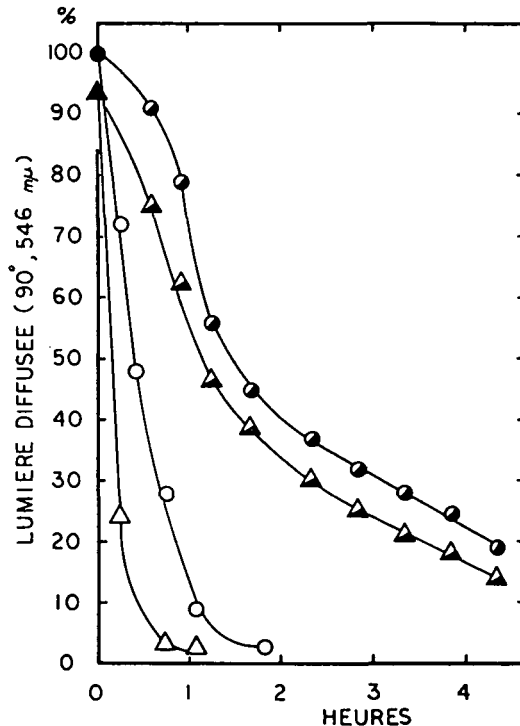


Fig. 5. Influence d'une incubation prolongée sur la capacité de contraction de chloroplastes isolés. Les chloroplastes sont mis en suspension dans une solution Tris (100 mM, pH 8) - NaCl (175 mM) où ils séjournent à l'obscurité (●, ▲) et à la lumière (○, △) pendant plusieurs heures. Au temps indiqués, la capacité des chloroplastes à se contracter en réponse à un traitement lumineux ($\lambda > 680 \text{ m}\mu$) est mesurée par une technique de diffusion de la lumière (mesure à 90° et à $546 \text{ m}\mu$) dans un milieu contenant KH_2PO_4 (50 mM, pH 6,0), NaCl (35 mM), MgCl_2 (5 mM), phénazine méthosulfate ($20 \mu\text{M}$) et des chloroplastes ($10 \mu\text{g}$ de chlorophylle par ml). ○, contraction après 10 sec.; △, contraction après 160 sec. La valeur 100% correspond à la contraction obtenue après 160 sec.

- (2) CATSKY, J. et B. SLAVIK, cités par Z. SESTAK et J. CATSKY. Dans *Le Chloroplaste, Croissance et Vieillesse*. Edité par C. SIRONVAL. p. 230. Masson et Cie, Paris, 1967.
- (3) SIEGENTHALER, P.A.: Synergetic effect of light and ageing on the swelling and photochemical activities of isolated chloroplasts. *Experientia*, 24, 1198-1199 (1968).
- (4) PACKER, L., P. A. SIEGENTHALER and P. S. NOBEL: Light induced volume changes in spinach chloroplasts. *J. Cell Biol.*, 26, 593-599 (1965).
- (5) PACKER, L.: Structural changes correlated with photochemical phosphorylation in chloroplast membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 75, 12-22 (1963).
- (6) DILLEY, R. A. and L. P. VERNON: Changes in light absorption and light scattering properties of spinach chloroplasts upon illumination: relationship to phosphorylation. *Biochem.*, 3, 817-824 (1964).

- (7) SIEGENTHALER, P. A. and L. PACKER: Light-dependent volume changes and reactions in chloroplasts I. Action of alkenylsuccinic acids and phenylmercuric acetate and possible relation to mechanism of stomatal control. *Plant Physiol.*, **40**, 785-791 (1965).
- (8) SIEGENTHALER, P. A.: Phenylmercuric acetate and phosphate control of light-dependent shrinkage and reactions in chloroplasts. *Physiol. Plant.*, **19**, 437-447 (1966).
- (9) PACKER, L. and P. A. SIEGENTHALER: Light-dependent volume changes and reactions in chloroplasts II. Action of anions. *Plant Physiol.*, **40**, 1080-1085 (1965).
- (10) NOBEL, P. S.: Relation of swelling and photophosphorylation to light-induced ion uptake by chloroplasts *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, **131**, 127-140 (1967).
- (11) NOBEL, P. S., S. MURAKAMI and A. TAKAMIYA: Localization of light-induced strontium accumulation in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.*, **7**, 263-275 (1966).
- (12) IZAWA, S. and N. E. GOOD: Effect of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts II. Electron microscopy. *Plant Physiol.*, **41**, 544-552 (1966).
- (13) DEAMER, D. W., A. R. CROFTS and L. PACKER: Mechanisms of light induced structural changes in chloroplasts I. Light-scattering increments and ultrastructural changes mediated by proton transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **131**, 81-96 (1967).
- (14) WHATLEY, F. R. and D. I. ARNON: Photosynthetic phosphorylation in plants. In *Methods in Enzymology* 6. Edited by S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN. p. 308-313. Academic Press Inc., New York, N. Y., 1963.
- (15) SIEGENTHALER, P. A.: La méthode hématocrite appliquée à la mesure des changements de volume de chloroplastes isolés d'épinard. *Ber. Schweiz. bot. Ges.*, **78**, 202-209 (1968).
- (16) BRUINSMA, J.: A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 576-578 (1961).
- (17) NISHIDA, K., N. TAMAI and K. RYOYAMA: Light-induced high-amplitude swelling and shrinking in isolated spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.*, **7**, 415-428 (1966).
- (18) IZAWA, S. and N. E. GOOD: Effects of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts II. Light-scattering and volume changes. *Plant Physiol.*, **41**, 533-543 (1966).
- (19) MERCER, F. V., A. J. HODGE, A. B. HOPE and J. D. MCLEAN: The structure and swelling properties of *Nitella* chloroplasts. *Austr. J. Biol. Sci.*, **8**, 1-18 (1955).
- (20) NISHIDA, K.: Osmotic swelling of isolated chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.*, **4**, 247-256 (1963).
- (21) DILLEY, R. A. and A. ROTHSTEIN: Chloroplast membrane characteristics. *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 427-443 (1967).
- (22) ITOH, M., S. IZAWA and K. SHIBATA: Shrinkage of whole chloroplasts upon illumination. *ibid.*, **66**, 319-327 (1963).